

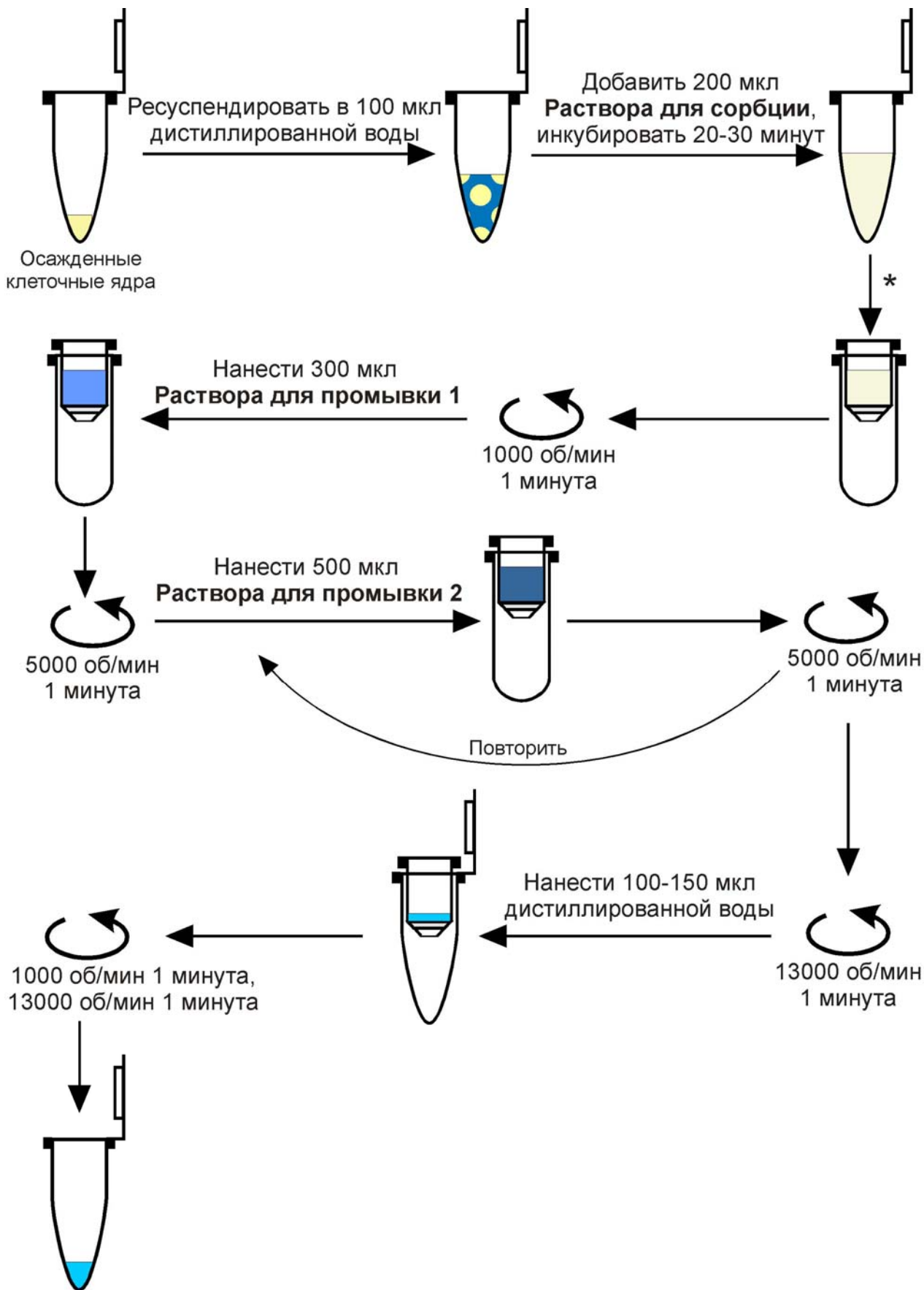


Инструкция по применению набора для выделения ДНК из клеточных ядер

На 100 выделений

Состав набора:

Микроколонки	100 шт
2 мл пробирки	100 шт
Раствор для сорбции	20 мл
Лизис-буфер	14 мл
Раствор для промывки 1	40 мл
Раствор для промывки 2 (концентрат)	30 мл



* Предварительно внести в колонку 100 мкл Раствора для промывки 1

Примечание:

- **Раствор для сорбции** перед использованием необходимо прогреть в течение 5-10 минут при $t^0=55-56^{\circ}\text{C}$ до полного растворения солей. **Нельзя нагревать раствор более 65°C .**
- В **Раствор для промывки 2** перед использованием необходимо добавить 70 мл этилового спирта (96-100%) и тщательно перемешать.
- Если дополнительно не указано, то все этапы выделения выполняются при комнатной температуре.

1. Поместить образец, содержащий 1-2 млн. клеток в пробирку. Центрифугировать при 2000 об/мин в течение 5 минут. Полностью удалить супернатант*.
2. Клетки ресуспендировать в 70 мкл PBS, добавить 140 мкл **Лизис-буфера**, тщательно перемешать на Vortex и инкубировать 2 мин.
3. Ядра отделить центрифугированием при 13000 об/мин в течение 10 минут. Полностью удалить супернатант*. Ядра ресуспендировать в 100 мкл дистиллированной воды.
4. Добавить 200 мкл **Раствора для сорбции**, инкубировать при комнатной температуре в течение 20-30 минут при постоянном перемешивании (на шейкере).

При использовании замороженных ядер время инкубации увеличивается до 40-60 минут.

5. Внести в колонку с фильтром 100 мкл **Раствора для промывки 1** и, затем, выделяемый образец. Центрифугировать 1 мин при 1000 об/мин.

Если над фильтром остался раствор центрифугировать дополнительно 1 мин при 5000 об/мин.

Необходимо учитывать, что объем колонки составляет 650 мкл. Если объем выделяемого образца превышает 650 мкл, последовательно нанести на фильтр весь образец, каждый раз удаляя фильтрат.

Необходимо учитывать, что на одну колонку можно нанести ДНК из ядер не более чем с 4 млн. клеток.

6. Нанести на фильтр 300 мкл **Раствора для промывки 1** и центрифугировать 1 мин при 5000 об/мин. Удалить фильтрат (см. п.7).

7. Нанести на фильтр 500 мкл **Раствора для промывки 2** и центрифугировать 1 мин при 5000 об/мин. Удалить фильтрат.

Удалить фильтрат из 2 мл пробирок в следующей последовательности:

- Извлечь **микроколонку** из 2 мл пробирки.
- Удерживая **микроколонку** в руке, удалить раствор из 2 мл пробирки с помощью вакуумного насоса либо с помощью микропипетки, используя отдельные наконечники для каждого образца, не касаясь стенок пробирки.
- Вернуть **микроколонку** в 2 мл пробирку.

8. Повторить п.7.

9. Центрифугировать пробирку с микроколонкой 1 минуту при 13000 об/мин для удаления остатков раствора.

10. Извлечь микроколонку и поместить ее в новую пробирку объемом 1,5 мл. Поставить новые пробирки с микроколонками в штатив. *(Микроколонки должны располагаться ВЕРТИКАЛЬНО! Необходимо следить, чтобы капли вносимой воды попадали строго на центр фильтра).*

11. Нанести на фильтр 100-150 мкл дистиллированной воды (либо деионизованной, или автоклавированной, обязательно проверенной на отсутствие ДНК-аз и РНК-аз).

12. Инкубировать микроколонку 3-5 мин при комнатной температуре, затем центрифугировать 1 мин при 1000 об/мин и 1 минуту при 13000 об/мин.

13. Убрать колонку с фильтром и перенести выделенный образец ДНК в новую пробирку. Полученный раствор содержит очищенную ДНК.

* супернатант удалять аккуратно, не повреждая осадок, при помощи микропипетки или вакуума.

Выход составит 4-7 мкг ДНК с 1 млн. клеток. Полученные образцы готовы к постановке ПЦР, секвенирования, рестрикции, лигирования и прочих реакций. Образцы могут быть использованы либо немедленно, либо в течение месяца при хранении при -20°C .

Сроки годности и особенности хранения:

- Все растворы хранить при $+15-25^{\circ}\text{C}$;
- Пробирки и микроколонки хранить в сухом месте при комнатной температуре;
- Срок годности набора-12 месяцев, начиная с даты изготовления.

